

①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3439980 A1**

⑤① Int. Cl. 4:
C12N 9/72
A 61 K 37/54

②① Aktenzeichen: P 34 39 980.1
②② Anmeldetag: 2. 11. 84
④③ Offenlegungstag: 7. 5. 86

DE 3439980 A1

⑦① Anmelder:
Behringwerke AG, 3550 Marburg, DE

⑦② Erfinder:
Pâques, Eric, Dr., 3550 Marburg, DE

Behördeneigentum

⑤④ Verfahren zur Reinigung sowie Pasteurisierung von Urokinase

Es wird ein Verfahren zur Reinigung sowie Pasteurisierung von Urokinase mit der Hilfe eines Ionenaustauschers beschrieben, wobei ein Produkt mit günstigem Verhältnis an hochmolekularer zu niedermolekularer Urokinase erhalten wird.

Das Produkt kann für therapeutische Zwecke verwendet werden.

DE 3439980 A1

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Reinigung von Urokinase, dadurch gekennzeichnet, daß eine Lösung von Urokinase mit einem Kationenaustauscher, der Urokinase binden kann in Kontakt gebracht wird, der beladene Austauscher durch eine Stufen-Elution von Verunreinigungen mit proteolytischer Aktivität befreit und die Urokinase eluiert und gegebenenfalls pasteurisiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine entsalzte Lösung von Urokinase verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine mit einem Anionenaustauscher behandelte Lösung von Urokinase verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das die Urokinase enthaltende Eluat in Gegenwart von Saccharose und gegebenenfalls Glycin 1 bis 20 Stunden bei einer Temperatur von 40-90°C und einem pH kleiner als 6, vorzugsweise von 4 bis 5,95, pasteurisiert wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Urokinase enthaltende Lösung von Salz befreit, die salzarme Lösung gegebenenfalls mit einem Anionenaustauscher zusammengebracht und der Austauscher abgetrennt, gegebenenfalls der Überstand oder andernfalls die Lösung auf einen pH von 5,4-5,6 eingestellt und mit CM-Cellulose zusammengebracht, der Austauscher abgetrennt, mit einem Puffer mit einem pH von 5,4-5,6 und einer Leitfähigkeit zwischen 5 und 10 mSi gewaschen und die Urokinase mit einem Puffer mit einem pH von 5,5 bis 9,5, eluiert und gegebenen-

11 11 11

. 2 .

3439980

5 falls die erhaltene Urokinaselösung mit 400-600 g/l Saccharose und 1-3 mol/l Glycin versetzt und 1-20 Stunden auf eine Temperatur von 40-90°C, vorzugsweise 55-65°C, bei einem pH kleiner als 6, vorzugsweise von 4 bis 5,95, erhitzt wird.

6. Verwendung einer Urokinase-Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 5 für therapeutische Zwecke.

Verfahren zur Reinigung sowie Pasteurisierung von Urokinase

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung sowie Pasteurisierung von Urokinase. Eine nach diesem Verfahren gewonnene Urokinase kann als Thrombolytikum verwendet werden.

5 Plasminogen wird unter dem Einfluß von Katalysatoren in Plasmin umgewandelt. Zu den Katalysatoren dieser Reaktion zählt Urokinase. Urokinase ist beispielsweise in Spuren im Urin des Menschen zu finden. Die Anwendung von Uroki-
10 nase zur Thrombolyse ist bekannt. Es ist auch bereits bekannt, daß die handelsüblichen Urokinase-Präparate häufig aus einer Mischung einer hoch- (54.000 M.W.) und einer niedermolekularen (33.000 M.W.) Form der Urokinase bestehen. Die hochmolekulare Urokinase (HMW-UK) ent-
15 spricht der nativen Form des Moleküles, während die niedermolekulare Form (LMW-UK) ein proteolytisches Abbauprodukt der HMW-UK darstellt.

Für die therapeutische Anwendung wird die HMW-UK vorge-
20 zogen, weil sie der natürlichen Form entspricht. Ob die Umwandlung in die niedermolekulare Form durch Autokatalyse oder durch kontaminierende Proteasen bewirkt wird, ist ungeklärt (J. Biochem. 90 (225-232) 1981; Thromb. Res. 23 (541-547) 1981).

25 Es sind bereits verschiedene Methoden zur Isolierung und Reinigung von Urokinase beschrieben worden. Diese Verfahren führen vorwiegend zur Herstellung von Urokinase-

DE 11 10

3439980

- 4 -

Präparaten, welche durch ein ungünstiges Verhältnis von HMW- zu LMW-UK gekennzeichnet sind.

5 In DE-OS 28 15 853 ist eine Methode für die Gewinnung der HMW-Urokinase beschrieben. Die Ausbeute bei der Anwendung dieses Verfahrens ist, verursacht durch die Entfernung der LMW-Anteile, sehr gering, auch weil der Abbau der HMW-Urokinase nicht verhindert wird.

10 Die vorliegende Erfindung hat sich die Aufgabe gestellt, eine Urokinase-Präparation mit einem hohen Anteil an HMW-Urokinase, wie er im Urin zu finden ist, und hoher Stabilität herzustellen.

15 Es wurde überraschenderweise gefunden, daß durch Bindung der Urokinase aus einer Lösung an einen Kationenaustauscher und eine Stufen-Gradienten-Elution Urokinase mit guter Ausbeute von begleitenden Proteinen abgetrennt werden kann und dieser Reinigungsvorgang die Stabilität
20 der HMW-Urokinase wesentlich erhöht. Es wurde weiterhin überraschenderweise gefunden, daß der Abbau der HMW-Urokinase während einer Hitzebehandlung zur Inaktivierung von Viren durch Verdünnen der Urokinaselösung auf eine Konzentration von 10.000 bis 100.000 IU/ml oder Einstel-
25 len auf einen pH-Wert kleiner als 6, vorzugsweise von 4 bis 5,95, verhindert werden kann.

Diese drei Verfahrensweisen können kombiniert werden.

30 Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Reinigung von Urokinase, worin fremde Stoffe mit proteolytischer Aktivität entfernt werden, und das die Herstellung eines Produktes von hoher Stabilität in guter Ausbeute ermöglicht.

35

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren für

die Pasteurisierung einer Lösung von Urokinase ohne wesentliche Verringerung des HMW-UK-Anteils und der Urokinase-Aktivität.

- 5 Gegenstand der Erfindung ist besonders ein Verfahren zur Reinigung von Urokinase, dadurch gekennzeichnet, daß eine Lösung von Urokinase mit einem Kationenaustauscher in Kontakt gebracht wird, der beladene Austauscher durch eine Stufen-Elution von Verunreinigungen mit proteolytischer Aktivität befreit und die Urokinase eluiert wird.

Als Ausgangslösung kann beispielsweise Urin eingesetzt werden.

- 15 Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Inaktivierung von pathogenen Viren in einer Urokinaselösung durch eine Hitzebehandlung, dadurch gekennzeichnet, daß die Urokinaselösung nach Einstellung auf einen pH-Wert kleiner als 6, vorzugsweise von 4 bis 5,95, und eine Urokinase-Konzentration von 10.000 bis 100.000 IU/ml in Anwesenheit eines Mono- oder Disaccharids oder Zuckeralkohols und gegebenenfalls einer Aminosäure mindestens 1 Stunde, vorzugsweise 8 bis 20 Stunden, bei einer Temperatur von 40-90°C, vorzugsweise 55-65°C, erhitzt wird. Anschließend kann die Urokinaselösung konzentriert und sterilfiltriert werden. Die Konzentration des Saccharids ist vorzugsweise 400-600 g/l, die der Aminosäure 1-3 mol/l.

- 30 Gegenstand der Erfindung ist ferner die Anwendung eines auf diese Art hergestellten Präparates für therapeutische Zwecke, das insbesondere durch Injektion, Perfusion oder analoge Weise verabreicht werden kann.

- 35 Falls die Urokinase enthaltende wässrige Lösung störende Mengen Salze enthält, wird sie zweckmäßigerweise weitgehend von diesen befreit.

Weitere begleitende unerwünschte Proteine können gegebenenfalls beispielsweise mit Hilfe eines Anionenaustauschers entfernt werden.

- 5 Ein bevorzugtes Verfahren besteht darin, daß aus der die Urokinase enthaltenden Lösung gegebenenfalls Salze entfernt werden, gegebenenfalls die salzarme Lösung mit einem Anionenaustauscher zusammengebracht und der Austauscher abgetrennt, gegebenenfalls der Überstand oder
- 10 andernfalls die entsalzte Lösung auf pH 5 bis 6, vorzugsweise 5,4-5,6, eingestellt und mit einem Kationenaustauscher, vorzugsweise CM-Cellulose, zusammengebracht wird. Der Kationenaustauscher wird mit einem Puffer, vorzugsweise bei pH 5,5, vorzugsweise mit einer Leit-
- 15 fähigkeit zwischen 5 und 10 mSi (20°C), gewaschen, und die Urokinase mit einem Puffer zwischen pH 5,5 und 9,5, vorzugsweise zwischen 6,5 und 9, vorzugsweise mit einer Leitfähigkeit zwischen 20 und 30 mSi (20°C) eluiert.
- 20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform kann man so verfahren, daß man die Urokinase enthaltende Lösung, beispielsweise Urin, gegebenenfalls entsalzt, gegebenenfalls durch Behandeln mit einem Anionenaustauscher von Verunreinigungen befreit, die Lösung auf pH 5,5 ein-
- 25 stellt, mit CM-Cellulose versetzt, diese abtrennt und mit einem Puffer von pH 5,5 enthaltend 0,07 mol/l Natriumacetat und 0,5 mol/l Glycin (Leitfähigkeit: 0 bis 5 mSi; 20°C) wäscht, sie dann mit einem Puffer, enthaltend 0,15 mol/l Natriumacetat und 0,5 mol/l Glycin, pH
- 30 5,5 (Leitfähigkeit: 5 bis 10 mSi; 20°C) wäscht und dann die Urokinase mit einem Puffer bei pH 9 (Leitfähigkeit: 20 bis 30 mSi; 20°C) eluiert.

Man kann weiterhin so verfahren, daß man das Eluat auf

35 einen pH-Wert von 5,5 einstellt und nach Zusatz von einem Mono- oder Oligosaccharid oder Zuckeralkohol, vor-

zugsweise 1 kg/l Saccharose, und gegebenenfalls einer wasserlöslichen Aminosäure, vorzugsweise 112 g/l Glycin, bei einer Endkonzentration zwischen 10.000 und 100.000 IU/ml Urokinase, vorzugsweise 50.000 IU/ml, 10 Stunden
5 bei 60°C erhitzt, konzentriert und steriltfiltriert.

Ein auf die beschriebene Weise hergestelltes Präparat zeichnet sich dadurch aus, daß es das der Ausgangslösung entsprechende Verhältnis an HMW/LMW-Urokinase und eine
10 hohe Reinheit aufweist und zugleich eine gute Stabilität besitzt.

Wenn beispielsweise ein Ausgangsmaterial mit einem Verhältnis von hochmolekularer zu niedermolekularer Uroki-
15 nase von 70/30 eingesetzt wurde, dann wurde ein Produkt mit gleichem Verhältnis von HMW- zu LMW-UK in einer Ausbeute von 85% und in einer Reinheit von über 90% erhalten. Falls das Waschen des Kationenaustauschers unterblieb, war das HMW/LMW-Verhältnis des Produkts 55/45,
20 die Ausbeute 90% und die Reinheit unter 60%. In diesem Fall war auch die Stabilität des Endproduktes geringer. Das Polymerenverhältnis verschob sich zugunsten des niedermolekularen Anteils beim Stehenlassen einer Lösung bei Raumtemperatur.

25 Das Verhältnis HMW/LMW-UK wurde nach Auftrennung der beiden Formen auf einer Mono-S-säule (FPLC-Pharmacia) durch Bestimmen der amidolytischen Aktivität ermittelt.

30 Ausbeute und Polymerenverhältnis des Endprodukts sind vom pH während des Erhitzungsschrittes abhängig. Vorteilhaft ist ein pH von etwa 5,5, wobei ein günstiges Verhältnis von hochmolekularer zu niedermolekularer Urokinase bei sehr guter Ausbeute erhalten wird.

35 Die Erfindung soll durch das nachstehende Beispiel näher erläutert werden.

Beispiel

1. Reinigung

Die urokinase-haltige Ausgangslösung wurde bei 4°C durch
5 Gelfiltration von Salz befreit, der Durchlauf gesammelt
und mit DEAE-Cellulose bei pH 8 von Verunreinigungen
befreit. Der Durchlauf wurde mit 300 g/l Saccharose und
37,5 g/l Glycin versetzt, mit Salzsäure auf pH 5,5 ein-
gestellt, bei 4°C mit CM-Cellulose versetzt, die mit
10 einer 0,07 mol/l Natrium-Acetat und 0,5 mol/l Glycin
enthaltenden Lösung mit pH 5,5 äquilibriert worden war,
und 1 Stunde gerührt. Das Gel wurde trocken gesaugt, mit
dem Äquilibrierpuffer gewaschen, in eine Säule gefüllt,
mit einem Puffer, enthaltend 0,15 mol/l Natrium-Acetat
15 und 0,5 mol/l Glycin, pH 5,5 (Leitfähigkeit: 7,8 - 8,1
mSi, 20°C), gewaschen, und anschließend die Urokinase
mit einer Lösung, enthaltend 0,2 mol/l Natrium-Acetat
und 0,5 mol/l Glycin, pH 9,0 (Leitfähigkeit: 26 - 30
mSi, 20°C) eluiert.

20

2. Virus-Inaktivierung

Das Eluat wurde mit 1 kg Saccarose und 112 g Glycin pro
Liter versetzt, mit Salzsäure auf pH 5,5 eingestellt,
auf eine Konzentration von 50.000 IU/ml Urokinase ver-
25 dünnt und anschließend 10 Stunden bei 60°C erhitzt. Die
erhitzte Urokinase-Lösung wurde konzentriert und an-
schließend sterilfiltriert.